УДК 595.132:632.21

К ИЗУЧЕНИЮ СТИМУЛОВ ГАЛЛООБРАЗОВАНИЯ У РАСТЕНИЙ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ НЕМАТОД

В. Г. Зиновьев

(Научно-исследовательский институт биологии Харьковского университета)

При изучении причин галлообразований у растений при нематодозах много внимания уделялось исследованию состава веществ, выделяемых нематодами в растительные ткани, и биохимических изменений, которые возникают в растениях в ответ на заражение гельминтами. Однако пусковые механизмы аномального роста при фитогельминтозах до сих пор не, установлены, а имеющиеся гипотезы экспериментально не обоснованы.

Маунтейн (Mountain, 1960) предполагает, что галлообразование *при мелойдогинозе растений* стимулируется веществами типа индолил-уксусной кислоты (ИУК), освобождающимися в инвазированных гельминтами растительных тканях в результате гидролиза этой кислотой протеиновых комплексов под влиянием протеолитических ферментов нематод. По его мнению, стимуляторы роста могут также синтезироваться из триптофана, образующегося в опухолевых тканях в процессе гидролиза белков секретами гельминтов. Овенс и Спект (Owens, Specht, 1964) считают, что целлюлаза, выделяемая нематодами, растворяет клеточные оболочки и способствует образованию синицитиальных гигантских клеток. Опубликованы данные и других авторов о ферментативной активности нематод, однако для выяснения значения экзоферментов гельминтов в процессах роста опухолей у растений при нематодозах необходимы дальнейшие исследования, поскольку литературные сведения о наличии тех или иных энзимов в секретах нематод противоречивы. Вопрос о том, какие ферменты выделяются в растительные ткани фитогельминтами разных видов, имеет первостепенное значение, т. к. только конкретные данные о химических средствах воздействия нематод на растения помогут разобраться во взаимоотношениях в системе паразит — хозяин при фитогельминтозах и установить факторы, индуцирующие рост опухолей у инвазируемых гельминтами растений. На основании изучения экскреторной активности фитогельминтов И. В. Бумбу (1968) полагает, что аммиак, аминокислоты и другие конечные продукты азотистого обмена, выделяемые гельминтами в живые растительные ткани, могут быть причиной образования галлов. Однако известно, что гигантские клетки образуются у переднего конца половозрелых самок галловых нематод, а рост опухолей стимулируется также и в тех случаях, когда анально-вульварная часть нематод находится вне тканей растений и их экскреты не попадают в ткани. Поэтому для выяснения роли экскретов нематод в опухолеобразовании у растений необходимы также дальнейшие исследования.

По данным С. Г. Мюге (1956), спиртовые вытяжки из галлов при мелойдогинозе растений стимулировали образование опухолей на корешках проростков азиатской фасоли. На основании этого автор считает, что аномальный рост тканей при фитогельминтозах индуцируют токсины, образующиеся в растительных тканях в результате воздействия на них гельминтов. Однако С. Г. Мюге не выяснил, образуются ли активи-

рующие рост вещества в растениях в результате механического воздействия на них гельминтов или иным путем. Известно, что спиртом извлекаются из растительных тканей ростовые вещества типа биоса (биотин и др.). Поэтому можно предположить, что эти стимуляторы роста содержались в вытяжках, которыми С. Г. Мюге вызывал образование опухолей. Нами обнаружен биотин как в тканях галлов, так и в экссудатах половозрелых самок галловой нематоды (Зиновьев, 1972). Возможно, что это вещество является составной частью экзоферментов нематод и способствует делению клеток растительных тканей. При мелойдогинозе растений в тканях галлов резко активизируются дыхательные ферменты (Мюге, 1956, Owens, Rubinstein, 1966, Endo, Veech, 1969) и значительно возрастает количество индольных соединений (Yu, Viglierchio, 1964), свободных аминокислот, нуклеотидов, ДНК, РНК, липидов, протеинов и других веществ (Owens, Specht, 1966) что свидетельствует, по-видимому, об интенсификации метаболизма в инвазированных гельминтами растительных тканях. Но имеющиеся в настоящее время экспериментальные данные еще не достаточны для объяснения этих биохимических изменений и цитогенетических механизмов превращения нормальных клеток в опухолевые под воздействием нематод. Решение этой проблемы осложняется прежде всего теми трудностями, с которыми сталкиваются экспериментаторы при изучении трофики фитогельминтов и их взаимоотношений с растениями-хозяевами, а также слабой изученностью стимулов роста и регуляторных механизмов (на молекулярном уровне) клеток незараженных растений.

Для изучения химического воздействия нематод на ростовые процессы у растений мы использовали культуру изолированных клеток, тканей и корней, чтобы иметь возможность изучить непосредственное воздействие на них нематод и их секретов вне связи с реакциями интактных растений на заражение гельминтами. Изучали воздействие секретов (экссудатов) половозрелых самок галловой нематоды *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White, 1919) Chitwood, 1949 на рост изолированных каллюсных тканей и клеток восприимчивых (морковь, томаты) и устойчивых (хлопчатник) к мелойдогинозу растений, а также воздействие секретов половозрелых особей стеблевой нематоды картофеля *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945 на рост изолированных клеток и тканей картофеля. Каллюсы моркови, томатов и картофеля получали путем выращивания кусочков (из корнеплодов моркови, стеблей томатов и ростков картофеля) этих растений на агаризованной питательной среде Мурасиге и Скуга (Бутенко, 1968), а каллюсы хлопчатника — из эпикотелей его проростков при воздействии на них пастой с 0,5%-ной ИУК. Суспензию клеток из ткани каллюсов получали в пробирках, вращающихся со скоростью 10—12 *об/час*. Изолированные каллюсные ткани и клетки выращивали затем во вращающихся пробирках при температуре 26°С в жидких питательных средах, содержащих макро- и микроэлементы по Мурасиге и Скуга: тиамин — 0,4 *мг/л*, пиридоксин — 0,2 *мг/л*, инозит — 20 *мг/л*, гидролизат казеина — 500 *мг/л* и кинетин — 0,5 *мг/л*, а вместо активаторов роста АНУ, ИУК и 2,4—Д использовали чистые и в сочетании с растительными вытяжками секреты нематод. Для получения последних только что извлеченных из растительных тканей гельминтов выдерживали в течение 2 часов в небольших количествах дистиллированной воды при комнатной температуре. Питательные среды с секретами нематод стерилизовали в автоклаве под давлением 1 атм. в течение 15 минут.

Выясняли также возможность образования галлов на изолированных корнях растений (пшеницы, ржи, люцерны, томатов) под влиянием

инвазионных личинок и секретов половозрелых самок галловой нематоды. В опытах использовали корни, только что изолированные от проростков растений, а также корни люцерны и томатов, непрерывно культивируемых с 1957 г. по 1970—1971 гг. Исследуемые корни выращивали на питательной среде Смирнова (Смирнов, 1970), а для стимулирования на них галлообразования под воздействием гельминтов и их секретов применяли следующие компоненты: вытяжки из листьев проростков растений, АНУ, ИУК, 2,4—Д, кинетин, триптофан, биотин, инозит. Инвазионных личинок галловой нематоды перед опытами стерилизовали в 0,2%-ном растворе сулемы в течение 2 минут. С изолированными корнями, также как и с изолированными клетками и тканями, в каждом варианте экспериментов проводилось по 10 параллельных опытов. Для выяснения факторов, индуцирующих рост опухолевых клеток и особенностей метаболизма у культивируемых клеток тканей и корней изучали нуклеиновый обмен гистохимическим методом (Паламарчук, Веселова, 1965).

Наблюдения показали, что секреты половозрелых самок галловой нематоды и половозрелых особей стеблевой нематоды картофеля также как и вытяжки из листьев проростков, использованных в опытах сельскохозяйственных культур не стимулировали рост изолированных клеток и тканей исследуемых видов растений. Но при добавлении к питательным средам секретов галловой нематоды в сочетании с водными вытяжками из здоровых тканей восприимчивых к мелойдогинозу растений (морковь, томаты) наблюдалось стимулирование роста их изолированных клеток и тканей (табл. 1 и 2). В аналогичных опытах с устойчивым к галловой нематоде хлопчатником этого не было. Полученные данные позволяют полагать, что аномальный рост у восприимчивых к мелойдогинозу растений стимулируется благодаря синергическому взаимодействию секретов галловых нематод с различными активаторами роста, содержащимися в растительных тканях.

Известно, что стеблевая нематода картофеля не вызывает новообразований у растений и ее физиологические адаптации к паразитизму совсем иные, чем у галловых нематод. Поэтому нам кажется естествен-

Таблица 1

Влияние секретов (экссудатов) **половозрелых самок** (100 штук) **галловой нематоды, 2,4—Д и растительных вытяжек на рост изолированных тканей и деление изолированных клеток томатов**

Вещества, добавляемые к питательной среде	Средний прирост (10 опытов)	
	сырого веса кусочков каллюсов (первоначальный вес 50 *мг*) за 10 суток, *мг*	количества клеток (первоначально пассировалось по 100 шт.) за 10 суток, шт.
Контроль	0	0
Секреты нематод	0	0
Водные вытяжки из листьев проростков томатов	10	0
Секреты нематод в сочетании с вытяжками из листьев проростков томатов	90	80
2,4—Д—1 *мг/л*	15	10
2,4—Д—1 *мг/л* в сочетании с вытяжками из листьев проростков томатов	120	110

ным, что в наших опытах секреты *Ditylenchus destructor* в сочетании с растительными экстрактами не оказывали стимулирующего влияния на рост изолированных клеток и тканей картофеля.

Мы не изучали цитогенетических изменений в культивируемых клетках, но при проведении гистохимических реакций установили, что воздействие секретов галловой нематоды в сочетании с растительными вытяжками на нуклеиновый обмен изолированных клеток томатов и моркови аналогично воздействию на него 2,4—Д и ИУК.

Таблица 2

Влияние секретов (экссудатов) половозрелых самок галловой нематоды, ИУК и растительных вытяжек на рост изолированных тканей и деление изолированных клеток моркови

Вещества, добавляемые к питательной среде	Средний прирост (10 опытов)	
	сырого веса кусочков каллюсов (первоначальный вес 50 *мг*) за 10 суток, *мг*	количества клеток (первоначально пассировалось по 100 шт.) за 10 суток, шт.
Контроль	0	0
Секреты нематод	0	0
Водные вытяжки из листьев моркови	20	0
Секреты нематод в сочетании с вытяжками из проростков моркови	100	70
ИУК—1 *мг/л*	20	20
ИУК—1 *мг/л* в сочетании с вытяжками из листьев проростков моркови	140	120

Нам не удалось стимулировать галлообразования на изолированных корнях восприимчивых и стойких к мелойдогинозу растений путем воздействия на них секретами половозрелых самок галловой нематоды. Инвазионные личинки этого вида гельминтов не образовывали галлов на корнях люцерны и томатов, длительное время лишенных надземных органов (непрерывная культура с 1957 г. по 1971 г.). Опухоли на этих корнях образовывались (под воздействием личинок) лишь при дополнительном их питании либо вытяжками из листьев проростков тех же растений, либо комплексом ростовых веществ: ИУК — 0,1, АНУ — 0,1, 2,4—Д — 0,5, триптофан — 0,5, биотин — 0,5, инозит — 0,2 *мг/л*. В последних двух вариантах опытов выращивали по 15 корней исследуемых видов растений, причем при питании их растительными вытяжками галлы образовывались на 10 корнях люцерны (рисунок) и 8 корнях томатов, а при применении ростовых веществ удалось стимулировать образование опухолей только на 7 корнях каждой культуры. При дополнительном питании исследуемых корней каждым из ростовых веществ в отдельности галлообразования не наблюдалось. Результаты этих опытов свидетельствуют о том, что галлообразование на корнях растений при мелойдогинозе зависит от притока к местам локализации гельминтов пластических веществ, главным образом стимуляторов роста, из надземных органов. Следует отметить, что галлы на изолированных корнях образовывались за счет утолщения центрального цилиндра и гипертрофии клеток коры, как это типично для первых этапов образования опухолей у растений при мелойдогинозе. В тканях наиболее интенсивно растущих опухолей количество нуклеиновых кислот заметно возрастало, по

сравнению с такими же участками незараженных корней. Об этом свидетельствовала более интенсивная сине-розовая окраска на срезах галлов при проведении реакции с метиловым зеленым и пиранином на РНК и ДНК. По-видимому, нуклеиновый обмен играет важную роль в процессах патологического разрастания растительных тканей под воздействием нематод.

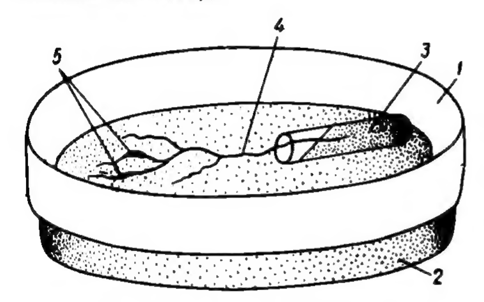


Схема опыта по воздействию инвазионных личинок галловой нематоды на корни, лишенные длительное время надземных органов:

1 — чашка Петри; *2* — твердая (агаризованная) питательная среда Смирнова; *3* — пробирка с агаризованной средой, содержащая вытяжки из листьев проростков люцерны; *4* — изолированный корень люцерны; *5* — опухоль, возникшая под воздействием инвазионных личинок галловой нематоды.

Инвазионные личинки галловой нематоды часто образовывали утолщения на корнях люцерны и томатов, только что изолированных от проростков этих растений, чего не зарегистрировано в аналогичных опытах с корнями проростков пшеницы и ржи, устойчивых к мелойдогинозу. Причем размер галлов на изолированных корнях люцерны и томатов увеличивался в течение 10 дней пассажа примерно вдвое при дополнительном питании этих корней растительными вытяжками. На основании этих данных можно предположить, что только что изолированные от проростков корни еще находились под влиянием веществ, транспортированных из семядолей и листьев. Однако для уточнения этого предположения необходимы дальнейшие исследования с учетом особенностей метаболизма у изолированных корней применяемых в экспериментах видов растений.

Таким образом, результаты наших исследований дают основание полагать, что рост опухолей на корнях восприимчивых к мелойдогинозу растений индуцируется благодаря взаимодействию выделений галловых нематод с какими-то пластическими веществами, содержащимися в растениях. Однако из-за отсутствия конкретных данных о химическом составе растительных экстрактов и секретов нематод пока нельзя сделать выводов относительно физиолого-биохимических стимулов аномального роста клеток и тканей при образовании галлов у растений под воздействием нематод. Раскрытие химической и физиологической сущности взаимоотношений нематод с растениями-хозяевами весьма важно в теоретическом и практическом отношении, поскольку оно позволит реально подойти к решению вопроса о целенаправленном подавлении патогенного действия гельминтов на растения посредством ингибирования галлообразования и будет способствовать познанию путем эволюции нематод к паразитизму, причин их различной патогенности и природы устойчивости сельскохозяйственных культур к нематодозам.

ЛИТЕРАТУРА

Бумбу И. В. 1968. Физиолого-биохимические исследования взаимоотношений в системе паразит — хозяин при некоторых фитогельминтозах. Автореф. Кишинев.

Бутенко Р. Г. 1968. Культура изолированных клеток растений. В сб.: «Клетка и клеточные структуры». М.

Зиновьев В. Г. 1972. К изучению причин галлообразования при фитогельминтозах. В сб.: «Нематоды растений». Воронеж.

Мюге С. Г. 1956. К трофической характеристике галловой нематоды. Журн. общ. биол., т. XVII, № 5.

Паламарчук И. А., Веселова Т. Д. 1965. Учебное пособие по ботанической гистохимии. М.
Смирнов А. М. 1970. Рост и метаболизм изолированных корней в стерильной культуре. М.
Mountain W. B. 1960. Mechanisms involved in plant-nematode relationships. Nematology edited by I. N. Sasser and W. R. Jenkins. The University of North Carolina, USA.
Owens R. G., Specht H. N. 1964. Root-knot histogenesis. Contribs Boyce Thompson Inst., v. 22, N 8.
Owens R. G., Specht H. N. 1966. Biochemical alterations induced in host tissues by root-knot nematodes. Ibid., v. 23, N 5.
Yu P. K., Viglierchio D. R. 1964. Plant growth substances and parasitic nematodes. I. Root-knot nematodes and tomato. Expl. Parasitol. New York. v. 15, N 3.
Endo R. Y., Veech J. A. 1969. The histochamical localization of oxidoreductive enzymes of soybeans infected with the root-knot nematode Meloidogyne incognita acrita. «Phytopathology», v. 59, N 4.
Owens Robert G., Rubinstein Joseph H. 1966. Metabolic changes induced by root-knot nematodes in host tissues «Contribs B. Thompson Inst., v. 23, N 5.

Поступила 17.XI 1972 г.

ON STUDY OF GALL FORMATION STIMULI IN PLANTS UNDER NEMATODA EFFECT

V. G. Zinoviev

(Research Institute of Biology, the Kharkov State University)

Summary

Secretions of the *Meloidogyne incognita* females stimulated growth and influenced the nucleic metabolism (on the analogy to DCPA and IAA) of isolated cells and tissues of susceptible plants (carrot, tomato) only in combination with extracts of these plants leaves. Invasion larvae formed galls on isolated roots of alfalfa and tomato only with additional dressing of the roots either by extracts of leaves of these plant sprouts or by complex growth-stimulating substances. The investigations are significant for understanding plants anomalous growth mechanisms with nematodoses.